动 物 学 研 究 2008，Oct. 29(5): 485—492　　CN 53-1040/Q　ISSN 0254-5853
Zoological Research　　DOI：10.3724/SP.J.1141.2008.05485

Myostatin 三维结构模建及分子进化分析

谢玉为，薛小平*，尹焕才，唐蕊华，苏　婧，宋　凯，呼延霆，汪　桦，杨　慧

（西北工业大学 生命科学院，西安　710072）

摘要：Myostatin(MST)为肌肉生长负调节因子，其功能受抑制可导致肌肉量增加。对MST核酸序列进行序列比对，构建进化树；采用同源模建方法首次模建MST成熟肽生物活性二聚体的四级结构，并预测MST与其受体ActRIIB的相互作用模式。进化树将肌肉生长抑制素基因（MSTN）分成4个亚家族：哺乳动物MSTN，鸟类MSTN以及鱼类MSTN 1和2。MST受纯化选择作用，在不同物种的直系同源基因具有较高的同源性，其中哺乳动物、鸟类MST C端活性肽氨基酸序列高度保守。表明哺乳动物、鸟类MST的结构、功能类似，且信号传导路径可能一致；而鱼类MST的调控机制可能存在较大差异。MST结构及其表面静电势和疏水氨基酸分布表明静电力和疏水相互作用在MST与其受体结合过程中可能起到十分重要的作用。

关键词：肌肉生长抑制素基因；分子进化；同源模建
中图分类号：Q523; Q349.5　　**文章标识码**：A　　**文章编号**：0254-5853-(2008)06-0485-08

Homology Modeling and Molecular Evolution Analysis of Myostatin

XIE Yu-wei, XUE Xiao-ping, YIN Huan-cai, TANG Rui-hua, SU Jing,
SONG Kai, HUYAN Ting, WANG Hua, YANG Hui

（*Faculty of Life Science, Northwestern Polytechnical University, Xi'an*　710072*, China*）

Abstract: *Myostatin* (MST) is the cytokine negatively regulated skeletal muscle growth factor, and the loss of function caused by mutations is associated with increased skeletal muscle mass. The multiple sequence alignment of the available MST cDNA sequences and the related evolutionary analyses were performed; the quarternary structures of MST homodimer and the MST: ActRIIB complex was built using homology modelling technique. The phylogenetic tree revealed that there were four sub-families, i.e., mammalian MSTN, avian MSTN, and fish MSTN1, 2 in the MST gene (MSTN) family. MST orthologous genes derived from different species had a high sequence identity, which were probably caused by the purifying selection. Particularly, the high degree of conservation of C-terminal sequences of mammalian and avian MST mature peptides suggested they shared the very similar structure, function and signal transduction pathway. The analyses of electrostatic potential and hydrophobic amino acid distribution of the structural models revealed that the electrostatic force and hydrophobic interaction played an important role in receptor recognition by MST.

Key words: Myostatin；Molecular evolution；Homology modeling

肌肉生长抑制素 (Myostatin, MST)，又名 GDF8 (growth differentiation factor 8)，属 TGF-β (transforming growth factor beta)超家族。MSTN 是 McPherron et al (1997)通过简并引物 PCR 方法从小鼠骨骼肌 cDNA 文库中克隆的一个新基因。MSTN 虽有 TGF-β 超家族的典型结构，但是与其他 TGF-β 家族成员的同源性很低。MST 具有其他 TGF-β 超家族成员的一般特征。其前体蛋白一般包括信号肽、N 端前肽结构域和 C 端成熟肽结构域，C 端成熟肽结构域含有 7 个保守的半胱氨酸。MST 前体蛋白经蛋白酶水解生成 C 端成熟区和 N 端前肽，两分子前肽通过二硫键与成熟肽二聚体结合形成无生物活性的复合物。当该复合物解体，MST 成熟肽二聚体可与其受体 ActRIIB (the activin type IIB

收稿日期：2008-05-13；接受日期：2008-08-15
*通讯作者（Corresponding author）, Tel：029-88460541，E-mail: xiaoping@fmmu.edu.cn

receptor)结合，触发 TGF-β 家族的信号转导途径（Zhu et al, 2004）。

MST 是由发育与成熟的骨骼肌表达的分泌型多肽，对肌肉生长具有负调控作用。通过基因打靶技术敲除 MST 基因的小鼠骨骼肌是正常野生型小鼠的 3 倍以上，但是在其他生长发育性状上无表型异常（Szabó et al, 1998）。MST 不仅对肌原细胞的分化、生长、发育具有调控作用，而且可直接或间接作用于脂肪组织，调节脂肪代谢和糖代谢过程，并可能抑制脂肪沉积。有研究发现，MST 突变纯合体小鼠比对照组平均体脂肪减少 70%（McPherron & Lee, 2002）。因此，MST 在肌萎缩（Ohsawa et al, 2006）、肌营养不良症（Cadavid et al, 1998）、代谢性疾病如 2 型-糖尿病的预防和治疗，以及畜牧业生产（Lee et al, 2005）等方面具有巨大的应用前景。

MST 参与调控肌肉生长、脂肪代谢和糖代谢的相关机制尚不清楚。一般认为，MST 与 TGF-β 超家族其他成员类似，其信号转导途径需要 smad2/3、smad4 蛋白的参与，smad7 是其途径的负调节因子。垂体生长激素、类胰岛素生长因子 1、follistatin 等也可通过非共价作用与 MST 活性二聚体形成复合物，导致 MST 活性受抑制 (Wolfman et al,2003)。然而 MST 晶体结构尚未得到解析，在一定程度上限制了其分子识别机制的进一步研究。因此，本文应用分子进化和同源模建手段，从蛋白质一级和三级结构的角度预测 MST 与其受体结合的可能相互作用方式。本文结果为进一步实验研究提供了一定的结构基础，同时为探索肌肉萎缩致病机理及治疗提供了线索。

1 材料和方法

本文中分子模建、能量优化在 IBM Z-pro 6233-42c 服务器上进行，采用 InsightII2005（Accelrys，USA）软件包完成。计算中选用的各项参数除特别指明均采用缺省值。

1.1 MSTN cDNA 序列数据库的建立

以 Myostatin 和 growth differentiation factor 8（GDF8）为关键词，搜索 GenBank 数据库（http://www.ncbi.nlm.nih.gov/），获取不同动物代表性 MST cDNA 序列及编码蛋白质序列。由于返回结果较多，分别选取各物种的代表性 MSTN，并采用 EditSeq 程序编辑序列，保存建库。该库 MSTN 序列分别来自于 6 种鸟类、18 种哺乳动物、16 种鱼类（表 1）。

1.2 序列比对分析及趋异度计算

采用 ClustalW1.83（Thompson et al,1994）软件对核酸序列和蛋白质序列进行多重序列比对，参数设为默认值。使用 MEGA4(Tamura et al,2007)软件计算各序列两两之间趋异度（divergence）并计算平均值和标准差。结果中数据分别采用 Jukes-Cantor、Kimura 2-parameter 和 Maximum Composite Likelihood (MCL)模型作为核苷酸取代模型计算得到。

1.3 进化树的构建、检验及进化选择分析

由于 MSTN 高度保守（见结果与分析 2.1），本文中采用趋异度相对较大的 cDNA 序列进行建树。使用 Phylip3.67 软件包的 dnaml 程序，采用最大似然法(Maximum likelihood, ML)构建进化树，转换/颠倒率（Transition/transversion ratio）设置为 2.0，所得进化树各分枝单位通过 Bootstrap 法检验，共 100 个循环。最大似然法分析中，以拓扑结构的枝长作为计算参数，使获得的每一个拓扑结构的似然率都为最大值，然后再挑出其中似然率最大的拓扑结构作为最优树。并使用 MEGA4 软件，构建基于距离的邻近法（neighbor joining, NJ）和基于独立特征的最大简约法（Maximum parsimony，MP）启发式检索建立系统进化树，MP 进化树各分支单位置信度通过 Bootstrap 法检验，共 1000 个循环。并对 NJ 进化树作系统进化的内部分枝检验。使用 MEGA4 软件包中基于密码子的 *Z* 检验（codon-based *Z*-Test）对解消假设 dN>dS 作单尾 *Z* 检验。

1.4 人 MST 成熟肽三维结构同源模建与优化

选取人 activin A 晶体结构（PDB ID:2ARP, 分辨率 0.2nm, Harrington et al, 2006）作为 MST 同源模建模板。以 Align123 程序对人 MST 成熟区和 activin A 氨基酸进行序列比对。应用 Modeller 程序构建蛋白质三维结构，产生 20 个结构，每个结构产生 10 个不同的环区结构，优化水平为中等（MD_level: refine.fast）。以 Profiles-3D 和 Prostat 对各结构进行评价，选取最优结构。

采用分子力学和分子动力学方法建立蛋白溶剂化模型，选用 CHARMM 力场。首先，对蛋白质在 pH 7.0 下加氢并在蛋白周围添加 1nm TIP3P 水分子，对所得体系分别用最陡下降法（steepest descent, SD）和牛顿-拉斐森法(adopted basis Newton-Raphson method, ABNR)方法进行 500 和 3000 步能量优化，直至能量梯度 RMS 小于 0.42kJ/(mol·nm)。

其次，采用分子动力学方法对体系模拟 100 ps。模拟温度为 298 K，步长为 0.001 ps，模拟过程中蛋白质主链原子固定。最后，从分子动力学模拟轨迹中选取能量最低构象，并进行能量优化。能量优化采用分级方法，首先对溶剂水和蛋白氢原子进行能量优化，进而优化环区侧链、环区主链、结构保守区侧链和结构保守区主链，直至全部开放优化。优化过程中采用 Profiles-3D 和 Ramachandran 图随时检验优化所得结构合理性，得到最终的溶剂化模型。

1.5 MST 表面静电势计算

应用 Insight II Delphi 模块计算蛋白表面静电势。体系中溶液的离子强度设为 0.145，以模拟生理 pH 环境。质和溶剂介电常数分别设为 2 和 80。计算时通过有限差分近似来求解非线性 Poisson-Boltzmann 方程，反复迭代直到收敛至连续两次得到的静电势

表 1　本研究中所用的 MSTN cDNA 和氨基酸序列

Tab. 1　Sources of Myostatin cDNA and amino acid sequences

物种 Species	常用名 Common name	cDNA ID	蛋白质序列 ID Protein sequence ID
Meleagris gallopavo	Turkey	AF019625	AAB86692
Columba livia	Pigeon	AF440863	AAL35277
Coturnix chinensis	Quail	AF440864	AAL35278
Gallus gallus	Chicken	AY448007	AAR18244
Anser anser	Goose	AY448009	AAR18246
Anas platyrhynchos	Duck	AF440861	AAL35275
Macaca fascicularis	Macaca	AY055750	AAL17640
Equus caballus	Horse	AB033541	BAB16046
Papio hamadryas	Baboon	AF019619	AAB86686
Ovis aries	Ovine	AF019622	AAB86689
Sus scrofa	Swine	AF019623	AAB86690
Rattus norvegicus	Rat	AF019624	AAB86691
Bos taurus	Bovine	AF019761	AAB81508
Lepus capensis swinhoei	Rabbit	AY169410	AAN87890
Canis familiaris	Canis	AY367768	AAR14343
Capra hircus	Goat	AY436347	AAR12161
Alopex lagopus	Fox	AY606017	AAT37502
Taurotragus derbianus	Giant eland	AY629304	AAT40568
Sylvicapra grimmia	Duiker	AY629308	AAT40572
Antilocapra americana	Pronghorn	AY629309	AAT40573
Mus musculus	Mouse	BC105674	AAI05675
Salmo salar	Atlantic salmon 1a	AJ344158	CAC51427
	Atlantic salmon 1b	AJ297267	CAC19541
Pan troglodytes	Chimpanzee	NM_001079919	ABR25254
Cervus elaphus xanthopygus	Wapiti	EF629535	NP_001073388
Homo sapiens	Human	NM_005259	NP_005250
Pseudobagrus fulvidraco	Bagrid catfish	DQ767966	ABH04961
Pseudosciaena crocea	Croaker	AY842933	AAW34054
Takifugu rubripes	Fugu 1	AY445322	AAR88255
	Fugu 2	AY445321	AAR88254
Oncorhynchus mykiss	Rainbow trout 1	AF273035	AAK71707
	Rainbow trout 2	AF273036	AAK71708
	Rainbowtrout 2a	DQ417326	ABD91702
sparus aurata	Seabream 1	AF258448	AAK53545
	Seabream 2	AY046314	AAL05943
Umbrina cirrosa	Umbrinal 1	AF316881	AAL26885
	Umbrinal 2	AY059386	AAL27648
Morone chrysops	White bass	AF197194	AAK28707
Ameiurus catus	White catfish	AY540994	AAS48405
Morone americana	White perch	AF290911	AAK67984
Danio rerio	Zabrafish 1	AF019626	AAB86693
	Zabrafish 2	AY614000	AAT77805
Epinephelus coioides	Grouper	AY856860	AAW47740
Morone saxatilis	Striped bass	AF290910	AAK67983
Tilapia mossambica	Tilapia	AF197193	AAK28706

值之差小于 10^{-6}KT/e (K为波尔兹曼常数，T为绝对温度，e为电子电荷)。计算结果采用connolly表面显示。

2 结果与讨论

2.1 MSTN cDNA 序列多重比对及趋异度计算结果

根据 MSTN cDNA 来源物种进行分类，将库内序列分成 3 组：哺乳类 MSTN、鸟类 MSTN 和鱼类 MSTN。通过序列比对，发现 MSTN cDNA 各成员间序列同源性处于一个较宽的范围，即 41.8%—99.8%，其中鸟类 MSTN 的同源性（93%—98%）最高，哺乳类的同源性（88.2%—99.8%）居其次，鱼类 MSTN 的同源性的范围较大(44.5%—99.5%)。另外，哺乳纲和鸟纲间的同源性较高（81.5%—85.6%），而鱼纲和鸟纲、哺乳纲之间的同源性较差，但也达到了 41.1%—62.9%。MST 成熟肽在脊柱动物门各物种间高度保守，其序列同源性均高于 86%，这一结果表明，MST 成熟肽不但在各物种间具有高度保守的三级结构，而且与其受体的结合模式有可能是类似的。

MST 蛋白质序列的同源性较 cDNA 序列高，为在一定程度上增加各成员序列间的趋异度，本文仅采用 MSTN cDNA 序列作为建树材料。3 种核苷酸取代模型（Jukes-Cantor、Kimura 2-parameter 和 MCL）所得序列趋异度类似。表 2 列出了 MSTN cDNA 序列组间和组内平均 MCL 距离（average MCL distance，AMD），序列两两间趋异度未列出。

表 2 MSTN cDNA 组内及组间 AMD（%）

Tab. 2 Average MCL distance（AMD）within and between MSTN groups calculated from cDNA sequences (%)

	哺乳类之间 Within ammalia	鸟类之间 Within Aves	鱼类之间 Within fish	哺乳类-鸟类 Mammalia-Aves	哺乳类-鱼类 Mammalia-Fish	鸟类-鱼类 Aves-Fish
AMD	0.147±0.016	0.093±0.015	0.591±0.052	0.346±0.044	1.103±0.124	1.177±0.136

2.2 进化树分析

采用三种建树方法——ML、MP 和 NJ 所得的进化树在拓扑结构上基本一致。说明在同源性较高的情况下，以上方法获得的系统进化树拓扑结构相差不大(Hall , 2005)。ML 树分枝自展值（MLB）标记在进化树的内分枝上（图 1）。其中 23 个内分枝的 MLB≥95%(占 47.9%)，36 条内分枝 MLB≥70%(占 76.6%)，说明该进化树的拓扑结构较好。

系统进化树将 MSTN 分成 4 个亚家族：哺乳类 MSTN，鸟类 MSTN 以及鱼类 MSTN 1 和 2。鱼类 MSTN 产生复制较早，MSTN 1 与 2 的分化要早于或者接近于两种不同 MSTN 同系物硬骨鱼目的分化。鲑科 MSTN 1 复制产生 MSTN 1a 和 MSTN 1b 两个旁系同源基因，该分化较 MSTN 1/2 晚。其中，虹鳟鱼（rainbow trout）MSTN 出现两次分化——MSTN 1 与 2，MSTN 1a 与 1b。目前，经测序的大多数鱼类 MSTN 都是 MSTN 1 的直系同源基因。斑马鱼（zabrafish）MSTN 分化较早，其 LAP (tency-associated peptide region)结构域与一些生物活性区域产生较大差异，但是所有鱼类的 MSTN 的生物活性结构域都是保守的(Kerr et al, 2005)。所以，鱼类 MSTN 亚家族之间功能上的差异主要表现在表达调控方面，而起主导作用的蛋白质结构差异不大。

2.3 检验正选择

dN 指每非同义取代位点的非同义取代数（number of nonsynonymous substitutions per nonsynonymous site），*dS* 指每同义取代位点的同义取代数（number of synonymous substitutions per synonymous site）。*dN*>*dS* 是该基因受到正选择作用的有力证据。Z 检验计算得到的（*dS*-*dN*）= 1.907，*dN*=*dS* 单尾检验的概率 *P*=0.029，差异显著，则接受 *dN*<*dS*。这一结果表明 MSTN 受到纯化选择（purifying selection）作用，以保持其重要的生物学功能。

2.4 MST 三维结构模建与表面静电势分析

MST 作为脊椎动物生长的重要调节因子，遭受负选择压力。此外，前文的序列比对分析表明 MST 不同物种成熟肽氨基酸序列同源性大于 86%，其中哺乳动物同源性大于 93.8%。因此，脊椎动物尤其是哺乳动物的 MST 可能具有极其相似的三维结构，可通过模建人 MST 三维结构来研究脊椎动物 MST 功能。

人 MST 与 Activin A 氨基酸序列一致性为 39.6%，相似性为 57.7%，序列比对结果见图 2。人类 MST 三维结构模型见图 3A。MST 结构模型与

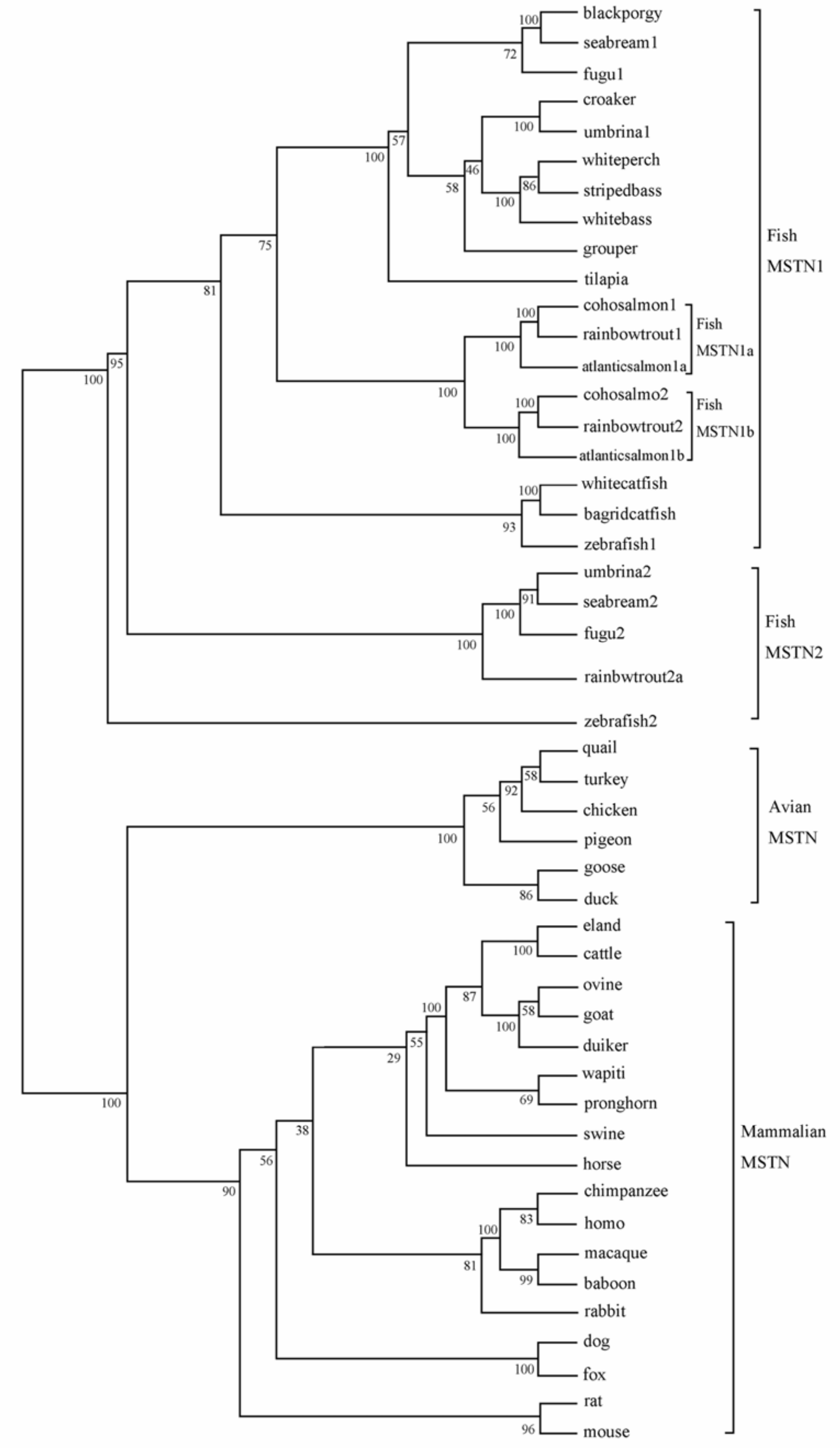

图 1 MSTN cDNA 最大似然树

Fig. 1 The maximum likelihood tree calculated from MSTN cDNA sequences

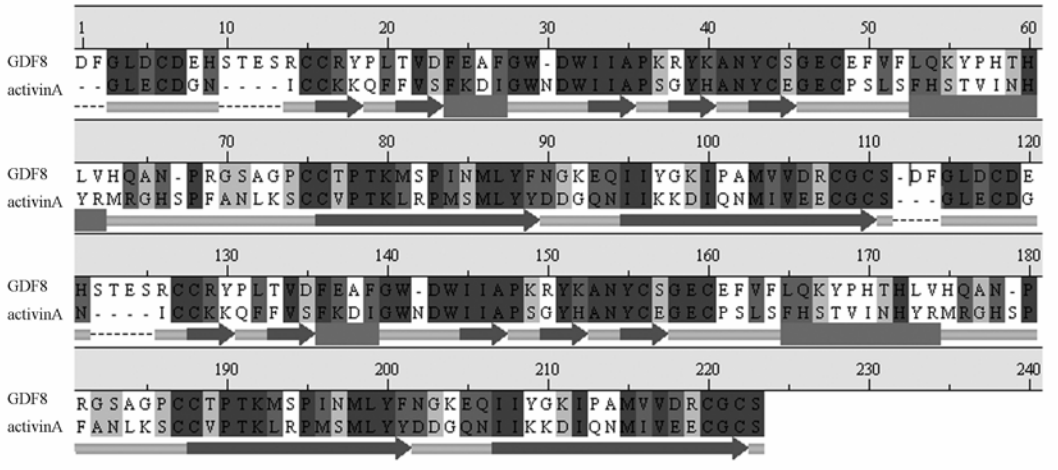

图 2　MST 与 activin A 氨基酸序列比对结果

Fig. 2　Amino acid residue sequence alignment between MST and activin A

Activin A 的二级结构显示于氨基酸序列下方，其中箭头和圆柱分别表示α-螺旋和β-折叠。

The secondary structure elements are assigned according to the activin A crystal structure with arrows for β-strands and rods for α-helices.

activin A 晶体结构主链原子均方根差值（RMSD）为 0.135 nm，全原子 RMSD 为 0.343 nm。图 3B 显示了二者的骨架结构重叠图，表明蛋白质的核心结构差别不大，但是环区构象差异相对较大。用 Profiles-3D（图 4）检测模建蛋白氨基酸序列与其三维结构的兼容性，结果显示无兼容残基，且所得分值为 95.92。该值大于可靠性最低阈值 44.53，略低于期望值 98.95。由于 181 至 189 位氨基酸残基和模板序列同源性较差，该处结构得分较低。但是，该局部结构位于蛋白质表面且距离活性区域较远，因此对整体结构合理性影响不大。用 Procheck（Laskowski et al,1993）方法计算所得的 Ramachandran 图显示，模型中 89.6%的残基二面角落在最优许可区，8.3%落在其他许可区，2.3%落在非许可区。以上结果表明我们模建的人 MST 结构总体上是合理的。

MST 二聚体和与 activin A 二聚体具有类似的“V 形”三维结构，两个单体通过一个二硫键结合。其中 β-折叠为主要二级结构，每个单体各有 3 对反平行 β-折叠，2 对最长的 β-折叠支撑蛋白两翼。MST 与受体结合模式可能与 activin A 类似，即两翼顶部外侧与受体 ActRIIB 进行结合，二硫键铰链区可能

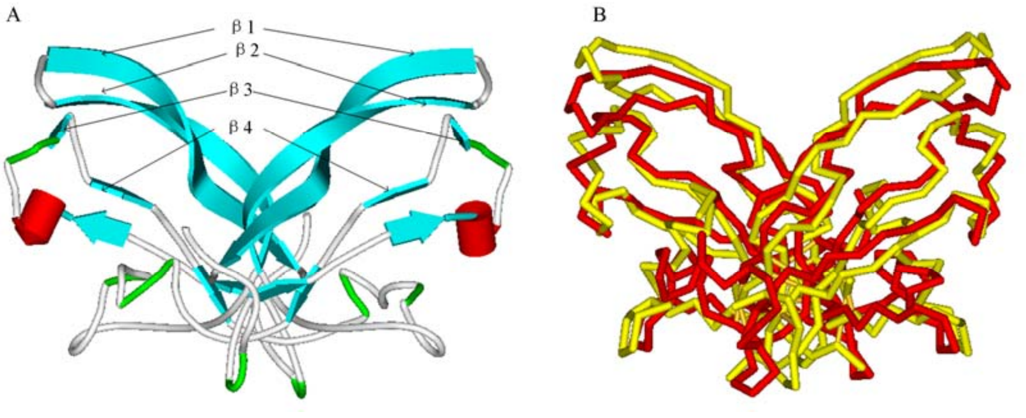

图 3　MST 结构示意图

Fig. 3　Structural representation of human MST mature homodimer

A：MST 成熟肽二聚体三级结构示意图；B：MST(红色)与人 activin A（黄色）分子叠合示意图。

A: Ribbon representation of MST mature homodimer; B: Structural superposition of the MST model (red) and the activin A crystal structure (yellow).

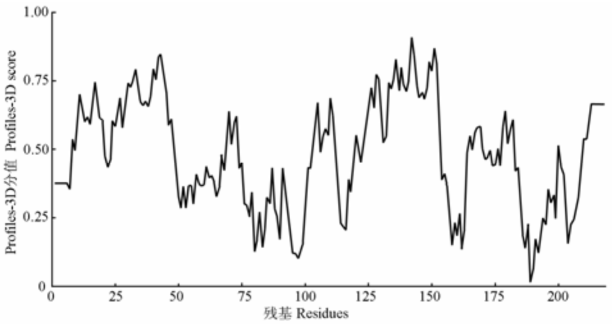

图 4　MST 结构模型的 Profiles-3D 图
Fig. 4　Profiles-3D plots calculated from the human MST 3D-model as a function of residue number

使得 MST 在配体-受体结合过程中表现出一定的柔性。

人activin A与小鼠ActRIIB 胞外区结合的复合物晶体结构已经被成功解析(PDB ID:1S4Y, Gree-nwald et al, 2004)。MST与activin A具有类似结构，且受体均为ActRIIB，表明其配体-受体作用模式可能相同。而且，人和小鼠ActRIIB胞外区氨基酸序列一致性高达 100%，因此可认为人与小鼠ActRIIB胞外区具有类似结构。将MST与 1S4Y中Activin A进行结构叠合，去除Activin A后，我们得到了人MST与ActRIIB的复合物结构模型。通过对该模型的进一步能量优化，可以预测MST与受体ActRIIB的相互作用模式。从图 5 可以看出，MST两翼脊部的 4 个β折叠（β1-4）与ActRIIB疏水核心在立体结构上互补。配体-受体相互作用界面处的表面积约为 27.54 nm^2。此外，该相互作用表面含有丰富的疏水氨基酸，如位于ActRIIB上的Val51、Cys55、Leu57、Val77、Phe79 和位于MST上的Ile33、Ala34、Leu57、Ile82、Leu85、Ile93、Ile94。因此我们推测这些疏水氨基酸间的相互作用在MST-ActRIIB相互识别和作用过程中起着关键作用。对配体和受体的分子表面静电势分析表明，二者相互作用界面的静电势互补。如图 5B所示，MST表面呈负静电势（红色），而ActRIIB呈正静电势（蓝色）。静电力为长程相互作用，因此我们推测静电相互作用在MST活性二聚体与ActRIIB的最初识别过程中起着非常关键的作用。首先，配体-受体通过静电力相互吸引，导致二者相互靠近；最终在疏水相互作用下形成MST:ActRIIB复合物，打开MST信号传导下游通路。这种非共价键的结合方式也可能是follistatin等抑制剂与MST结合，抑制其生物活性主要作用方式。

3　结　论

本文从分子进化角度分析了 MST cDNA 序列的系统起源，构建了 MSTN 的分子进化树。进化树将 MSTN 分成 4 个亚家族：哺乳动物 MSTN、鸟类 MSTN 和鱼类的 2 个拷贝 MSTN 1、2。通过基于密码子的 Z 检验发现 MSTN 中性突变占主导作用，受

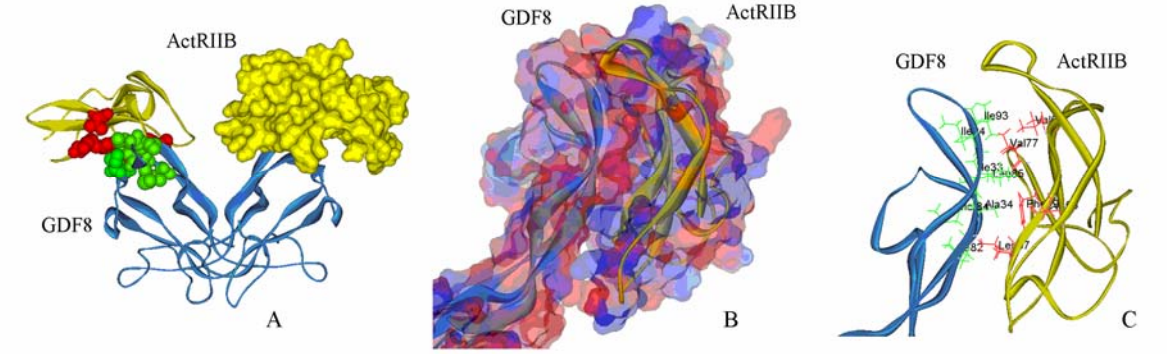

图 5　MST-ActRIIB 复合物结构模型示意图
Fig. 5　Structural model of the MST- ActRIIB complex

A: MST 同源二聚体（蓝色）与 2 分子 ActRIIB （黄色）相互作用形成复合物的结构图。受体-配体相互作用表面疏水氨基酸采用 CPK 原子模型显示，颜色分别为红色和绿色。B: MST 与 ActRIIB 相互作用区域的表面静电势。C：MST 与 ActRIIB 相互作用区域疏水氨基酸分布图。

A：Complex structure shows the interaction of one MST molecule (blue) with two ActRIIB molecules (yellow). The hydrophobic residues located at the interaction interface between MST and ActRIIB are indicated by CPK model with red color for ActRIIB and green color for MST, respectively. B: Electrostatic surface potential distribution maps of the interaction interface. C: Distribution of hydrophobic residues at the interaction interface, with residues from MST and ActRIIB colored in green and red, respectively.

到纯化进化作用。MSTN 作为一种具有重要生理功能的生物大分子在进化上表现出强保守性。MSTN 的生物活性结构域在 MSTN 直系同源基因中高度保守，各亚家族之间的分化、差异主要集中在 MST 蛋白的表达、调控方面。

MST 成熟肽区域氨基酸序列高度保守说明 MST 成熟肽结构及其与受体结合模式可能十分类似。以Activin晶体结构为模板首次同源模建了MST 成熟肽活性二聚体三维结构，采用 Profiles-3D 和 Ramachandran 图检验模建结构精度。通过分子叠合与表面静电势分析，预测了 MST 与其受体——ActRIIB 结合的大致活性区域，疏水相互作用与静电力是 MST 与 ActRIIB 相互作用的最主要驱动力。以上研究为 MST 结构、功能研究奠定了坚实基础，同时对肌萎缩等疾病的治疗提供了一定的理论基础。

参考文献：

Gonzalez-Cadavid NF, Taylor WE, Yarasheski K, Sinha-Hikim I, Ma K, Ezzat S, Shen RQ, Lalani R, Asa S, Mamita M, Nai G, Arver S, Bhasin S. 1998. Organization of the human MST gene and expression in healthy men and HIV-infected men with muscle wasting[J]. *PNAS* , **95**: 14938-14943.

Greenwald J, Vega ME, Allendorph GP, Fischer WH, Vale W, Choe S. 2004. A flexible activin explains the membrane-dependent cooperative assembly of TGF-β family receptors[J]. *Molecular Cell*, **15**(3): 485-489.

Hall BG. 2005. Comparison of the accuracies of several phylogenetic methods using protein and DNA sequences[J]. *Molecular Biology and Evolution*, **22**(3): 792-802.

Harrington AE, Morris-Triggs SA, Ruotolo BT, Robinson CV, Ohnuma S, Hyvönen M. 2006. Structural basis for the inhibition of activin signalling by follistatin[J]. *EMBO*, **25**(5): 1035-1045.

Kerr T, Roalson EH, Rodgers BD. 2005. Phylogenetic analysis of the MST gene sub-family and the differential expression of a novel member in zebrafish[J]. *Evol Dev*,**7**(5): 390-400.

Laskowski RA, MacArthur MW, Moss DS, Thornton JM. 1993. PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures[J]. *Appl. Cryst* , **26**: 283-291.

Lee SJ, Reed LA, Davies MV, Girgenrath S, Goad ME, Tomkinson KN, Wright JF, Barker C, Ehrmantraut G, Holmstrom J, Trowell B, Gertz B, Jiang MS, Sebald SM, Matzuk M, Li E, Liang LF, Quattlebaum E, Stotish RL, Wolfman NM. 2005. Regulation of muscle growth by multiple ligands signaling through activin type II receptors[J]. *PNAS*, **102**(50): 18117-18122.

McPherron AC, Lawler AM, Lee SJ. 1997. Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF-beta superfamily member[J]. *Nature*, **387**(6628): 83-90.

McPherron AC,Lee SJ. 2002. Suppression of body fat accumulation in MST-deficient mice[J]. *J Clin Invest*, **109**(5): 595-601.

Ohsawa Y, Hagiwara H, Nakatani M, Yasue A, Moriyama K, Murakami T, Tsuchida K, Noji S, Sunada Y. 2006. Muscular atrophy of caveolin-3-deficient mice is rescued by MST inhibition[J]. *J Clin Invest*, **116**: 2924-2934.

Szabó G, Dallmann G, Müller G, Patthy L, Soller M, Varga L. 1998. A deletion in the MST gene causes the compact (Cmpt) hypermuscular mutation in mice[J]. *Mammalian Genome*, **9**: 671-672.

Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S. 2007. MEGA4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0[J]. *Mol Biol Evol*, **24**(8): 1596-1599.

Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. 1994. CLUSTALW: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighing, position specific gap penalties and weight matrix choice[J]. *Nucleic Acids Res*, **l22**: 4673-4680.

Wolfman NM, McPherron AC, Pappano WN, Davies MV, Song K, Tomkinson KN, Wright JF, Zhao L, Sebald SM, Greenspan DS, Lee SJ. 2003. Activation of latent myostatin by the BMP-1/tolloid family of metalloproteinases[J]. *PNAS*, **100**(26): 15842-15846.

Zhu X, Topouzis S, Liang LF, Stotish RL. 2004. MST signaling through Smad2, Smad3 and Smad4 is regulated by the inhibitory Smad7 by a negative feedback mechanism[J]. *Cytokine*, **26**: 262-272.